

## 抗菌性ペプチド Magainin 2 と Tachyplesin I の細菌選択的相乗効果： カクテル療法への可能性

小林 聖 枝

### Bacteria-Selective Synergism between the Antimicrobial Peptides Magainin 2 and Tachyplesin I: Toward Cocktail Therapy

Satoe KOBAYASHI<sup>1)</sup>

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received August 14, 2002)

Magainin 2 and tachyplesin I (T-SS) are membrane-permeabilizing antimicrobial peptides discovered in frog skin and horseshoe crab hemolymph, respectively. They are classified into different secondary structural classes, i.e.,  $\alpha$ -helix and cyclic  $\beta$ -sheet, respectively. We found that F5W-magainin 2 (MG2) and T-SS showed marked synergistic effects against gram-negative and -positive bacteria without enhancing hemolytic activity as a measure of toxicity. The results of dye-release experiments using liposomes suggested that the selective synergism is mainly due to anionic phospholipid-specific synergism in membrane permeabilization. Furthermore, the cyclic structure of T-SS was found to be necessary for synergism because a linear analogue of T-SS did not show good synergism with MG2. These novel observations suggest the possibility of development of cocktail therapeutic regimens using combinations of antimicrobial peptides.

**Key words**—antimicrobial peptide; synergism; magainin 2; tachyplesin I;  $\alpha$ -helix; cyclic  $\beta$ -sheet

#### 1. はじめに

病原微生物に対する先天的な生体防御機構として、抗菌性ペプチドの存在がヒトを含むあらゆる生物において明らかとなっており、その数は現在 500 種類以上に及ぶ。<sup>2-5)</sup> 抗菌性ペプチドはアミノ酸 15-40 残基からなり、全体として塩基性、そして両親媒性であるという共通点を示す一方で、膜中など疎水的環境に置かれたときにとる二次構造については、 $\alpha$ ヘリックス構造、 $\beta$ シート構造、ループ構造などの多様性を示す。<sup>2-5)</sup> 抗菌性ペプチドについては、一般に細菌膜の脂質部分に作用し膜のバリアー能を破壊することが主な作用であると考えられている。<sup>6,7)</sup> しかし最近、筆者らは抗菌性ペプチドの多様性という観点から研究を行い、(1) アジアヒキガエル由来の buforin 2 は分子中央の Pro に由来する屈曲したヘリックス構造によって膜バリアー能を破壊することなく効率的に膜を透過すること、<sup>8)</sup> 及び(2)

カプトガニ由来、環状  $\beta$  シート構造の tachyplesin I (T-SS) はその環状構造によって膜破壊作用以外にも高いリポポリサッカライド選択性が付与されていること、<sup>9)</sup> という抗菌性ペプチドの新たな性質を明らかにすることができた。細胞内物質を作用点とする抗菌性ペプチドの存在もいくつか示唆されており、<sup>10-12)</sup> 抗菌性ペプチドの多様性に関する研究については今後の発展が期待される。

近年、医療現場において従来の抗生物質に対する薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっており、新規作用機作を持つ抗菌物質の開発は 1 つの大きな課題である。抗菌性ペプチドは、(1) 広い抗菌スペクトルを示す、(2) 菌への選択毒性が高い、(3) 耐性菌を生じにくい、などの長所を有しており、<sup>2-5)</sup> この候補として期待される。事実これら抗菌性ペプチドについては、その作用メカニズムについてだけでなく、<sup>6,7,13,14)</sup> 構造活性相関、<sup>15-19)</sup> 大量生産系の開発<sup>20,21)</sup> についても精力的に研究がなされており、現在海外では臨床試験段階にまで進んでいるものもある。<sup>5)</sup>

このような抗菌性ペプチドを単独で用いるだけで

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町)

\*本総説は、平成 13 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

なく、さらに併用することで相乗効果が得られれば、投与量を減らすことができ副作用の軽減が期待できる。これまでに抗生物質と抗菌性ペプチド間の相乗効果については多数報告があるが、<sup>22,23)</sup> 抗菌性ペプチド間では数例しかない。代表的な例として magainin 2 と PGLa 間<sup>24)</sup> あるいは dermaseptin ファミリー間<sup>25)</sup> の相乗効果が挙げられる。いずれも同一生物由来の構造も同じ  $\alpha$  ヘリックス構造をとるペプチド間の相乗効果であり、その生物学的意義を考えると興味深い。しかし、これらの組み合わせでは、抗菌活性だけでなく毒性も上昇してしまうことが報告されており、臨床応用を考える上で困難な問題を与える。

筆者らは異なる生物種由来でしかも構造も異なった抗菌性ペプチド、F5W-magainin 2 (MG2) (アフリカツメガエル由来、 $\alpha$  ヘリックス構造)<sup>6,7,26)</sup> と T-SS (カブトガニ由来、環状  $\beta$  シート構造)<sup>7,27)</sup> が毒性につながる溶血活性は低く抑えたまま抗菌活性においてのみ選択的に高い相乗効果を発現することを世界に先駆けて発見した。<sup>28)</sup> 本総説ではこの成果について記述する。

## 2. 抗菌活性

グラム陰性菌としては大腸菌を、グラム陽性菌としては表皮性ブドウ球菌を用い、抗菌活性における相乗効果を評価した (Table 1)。表中、各々のペプチド単独、あるいは他のペプチドと組み合わせた場合の最小発育阻止濃度 (MIC) で抗菌活性を示し、相乗効果の程度は fractional inhibitory concentration (FIC) index を用いて示した。FIC index 0.5 以下で相乗効果があると一般に評価される。<sup>29,30)</sup> まず各々のペプチド単独の MIC を評価し、次に一方のペプチドがその MIC の約 1/10 一定濃度で共存した場合の他方のペプチドの MIC を評価し、FIC index を求めた。よって 1 つの組み合わせにつき 2 通りの FIC index を Table 1 に示してある。結果、MG2 と T-SS の組み合わせではグラム陰性菌、グラム陽性菌、両方に対して強い相乗効果を示した (FIC index ~0.3)。さらに T-SS の直鎖状誘導體 (T-Acm, Fig. 1)<sup>31-33)</sup> を T-SS のかわりに用いたところ、相乗効果は見られなかった。よって、MG2 との相乗効果発揮において、T-SS のジスルフィド結合によって保たれた環状構造が重要であることが示唆された。

Table 1. Antimicrobial Activities of Peptides Alone or in Combination with Other Peptides

Bacteria	MIC ( $\mu$ M) <sup>a)</sup>		FIC index <sup>b)</sup>
	Alone <sup>c)</sup>	Combination	
	MG2	MG2 + T-SS	
<i>E. coli</i>	20	1.25 + 0.1	0.26
<i>S. epidermidis</i>	40	1.25 + 0.1	0.23
	T-SS	T-SS + MG2	
<i>E. coli</i>	0.5	0.125 + 2	0.35
<i>S. epidermidis</i>	0.5	0.125 + 4	0.35
	MG2	MG2 + T-Acm	
<i>E. coli</i>	20	10 + 0.2	0.6
<i>S. epidermidis</i>	40	20 + 0.1	0.55
	T-Acm	T-Acm + MG2	
<i>E. coli</i>	2	1 + 2	0.6
<i>S. epidermidis</i>	2	1 + 4	0.6

a) Minimal inhibitory concentration (MIC) against *E. coli* ATCC25922 and *S. epidermidis* ATCC12228. b) The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated as follows: FIC index = [A]/MIC<sub>A</sub> + [B]/MIC<sub>B</sub>, where MIC<sub>A</sub> and MIC<sub>B</sub> are the MICs of peptides A and B alone, respectively, and [A] and [B] are the MICs of peptides A and B in combination, respectively. c) MIC values were determined by serial two-fold dilutions of peptides. Therefore MIC values within two-fold were within experimental errors. We predetermined the MIC value of each peptide alone. Combination experiments were then carried out and, in parallel, the MIC of each peptide alone was redetermined as a control. The redetermined MIC values of each peptide alone are shown. (Modified from Table 1 of [28] with kind permission of American Chemical Society).

MG2: GIGKWLHSAKFKGKAFVGEIMNS

T-SS: KWCFRVCYR  
          |      |      |  
          NH<sub>2</sub>-RCRRYICIG

T-Acm: KWCFRVCYRGICYRRCR-NH<sub>2</sub>  
          |      |      |      |  
          Acm  Acm  Acm  Acm

PGLa: GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH<sub>2</sub>

Fig. 1. Amino Acid Sequences of the Peptides Used in This Study

## 3. 細菌膜モデル (酸性リン脂質含有膜) における膜バリアー能破壊活性

次に相乗効果発揮のメカニズムを検討するために、細菌膜モデルを用い、膜バリアー能破壊作用における相乗効果の有無を検討した。MG2 と T-SS はいずれも代表的な膜作動性抗菌ペプチドとして知られており、負電荷を持った細菌細胞膜のバリアー

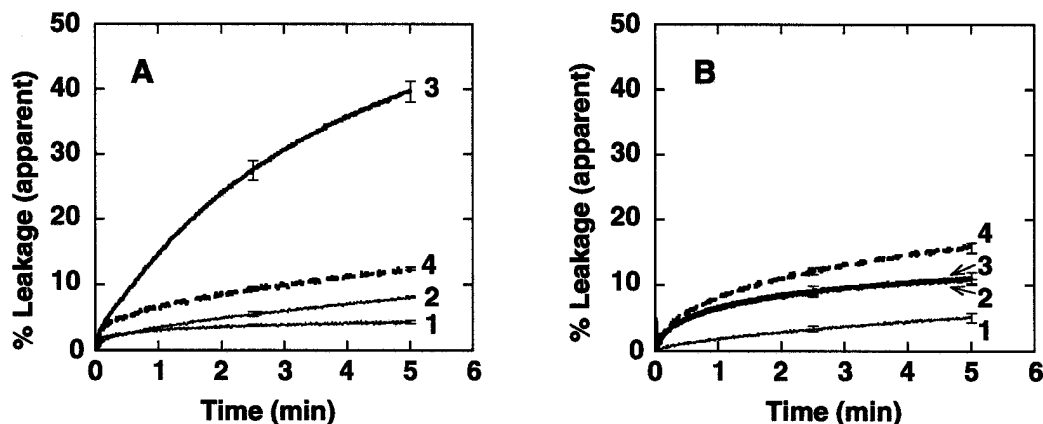


Fig. 2. Membrane Permeabilization Activity against Negatively Charged LUVs

The peptides were added to calcein-loaded LUVs composed of PG/PC (1/1). The dye release was fluorometrically detected as a function of time at 30°C. (A) Trace 1: 0.575  $\mu$ M MG2, Trace 2: 0.275  $\mu$ M T-SS, Trace 3: a mixture of 0.575  $\mu$ M MG2 and 0.275  $\mu$ M T-SS, Trace 4: the arithmetic sum of traces 1 and 2. [Lipid] = 242  $\mu$ M. (B) Trace 1: 0.13  $\mu$ M MG2, Trace 2: 2.5  $\mu$ M T-Acm, Trace 3: a mixture of 0.13  $\mu$ M MG2 and 2.5  $\mu$ M T-Acm, Trace 4: the arithmetic sum of traces 1 and 2. [Lipid] = 32  $\mu$ M. (Reprinted with kind permission from [28]. Copyright 2001 American Chemical Society).

能を破壊することで抗菌活性を発揮すると考えられている。<sup>26,34–36</sup> 酸性リン脂質が表面に露出した細菌細胞膜モデルとしては、酸性リン脂質ホスファチジルグリセロール (PG) と双イオン性リン脂質ホスファチジルコリン (PC) とで構成されたリポソーム (large unilamellar vesicles, LUVs) を用い、2つのペプチドの混合条件を様々に変えて、リポソーム内水相に内封した蛍光色素カルセインの漏出を評価した。PG含有膜は細菌細胞膜の良いモデルであり、抗菌性ペプチドの作用メカニズムを検討するのによく用いられている。<sup>6–8,13,15,17,32–34,36–41</sup> MG2とT-SSを組み合わせた場合の代表的な結果をFig. 2Aに示した。低濃度のMG2とT-SSは色素の漏出をほとんど引き起こさないが (trace 1と2)、これらを混合した場合 (trace 3) では trace 1と trace 2の算術和 (trace 4) と比較して活性は大きく上昇した。よって膜バリアー能破壊作用において強い相乗効果があることがわかった。一方、MG2/T-Acmの組み合わせの場合 (Fig. 2B)、両者を混合した場合の活性は (trace 3)、各々単独の活性の算術和 (trace 4) を下回った。よってこの場合、併用しても相乗効果は得られず、むしろお互いの活性を若干阻害することがわかった。後者の組み合わせにおけるこの結果は、2つのペプチドが完全に独立に働くと仮定した場合に予想される結果、つまりお互いの正電荷同士の反発により膜への結合を阻害しあうという結果に一致する。

Figures 2A, 2Bに示された結果は抗菌活性におけ

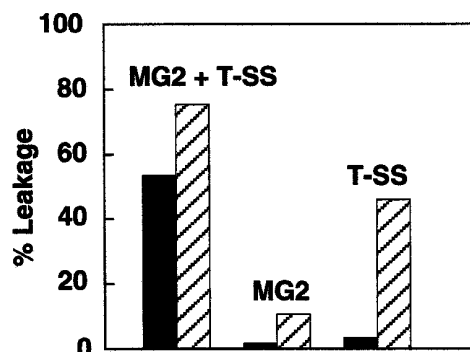


Fig. 3. Comparison of the Leakage of FITC-Dextran from Negatively Charged LUVs with That of Calcein

The peptides were incubated with FITC-dextran-loaded LUVs (closed bar) or calcein-loaded LUVs (hatched bar) composed of PG and PC (1/1) for 5 min at 30°C. The dye leakage was fluorometrically detected and the percent leakage values were shown by bars: left bars: a mixture of 0.75  $\mu$ M MG2 and 0.75  $\mu$ M T-SS, central bars: 0.75  $\mu$ M MG2, right bars: 0.75  $\mu$ M T-SS. [Lipid] = 200  $\mu$ M.

る結果とよく対応しており、よって細菌に対する相乗効果発揮のメカニズムが細菌細胞膜破壊活性における相乗効果に関連していることが示唆された。

さらに、ペプチドによって形成される膜障害の大きさを評価するために、カルセイン (M.W. 623) よりも高分子量のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識デキストラン (M.W. 4400) の漏出を評価し、カルセインの場合と比較した (Fig. 3)。MG2あるいはT-SSを単独で用いた場合、カルセインがある程度漏出する条件下でもFITCデキストランはほとんど漏出しなかったが、両者を併用するとカルセインだけでなくFITCデキストランも漏出

するようになり、より大きな膜障害が引き起こされるようになることが示唆された。

#### 4. 溶血活性

抗菌性ペプチドを併用することで抗菌活性において強い相乗効果が得られたとしても、毒性まで上昇してしまうのであれば臨床への適用は困難である。細菌に対する MIC と毒性を示す濃度とが離れているほどより治療係数の高い、安全性の高い抗菌剤だと言える。そこで、表皮性ブドウ球菌に対する MIC (Table 1) の 100 倍濃度における溶血活性を治療係数の指標として用い、Fig. 4 に示した。まず単独で用いた場合、T-SS の MIC は  $0.5 \mu\text{M}$  であり、MG2 ( $40 \mu\text{M}$ ) に比べて低濃度で菌の発育を阻止するが、各々の MIC の 100 倍濃度条件下 ( $50 \mu\text{M}$ ,  $4000 \mu\text{M}$ ) においては T-SS は MG2 と同等の強い溶血活性を示してしまい (Fig. 4A, cross-hatched and striped bars), 結局治療係数は両者同等であると言える。MG2 と T-SS を併用した場合には、抗菌活性は上昇するが (Table 1), MIC の 100 倍濃度条件下の溶血活性 (Fig. 4A, black bar) は各々のペプチドを単独で用いた場合 (Fig. 4A, cross-hatched and striped bars) と比較して大きく減少し、治療係数に改善が見られた。このような改善がみられたのは、MG2 と T-SS が溶血活性においては相乗効果を発揮しないためである。これは混合剤中の MG2 と T-SS 各々の溶血活性 (Fig. 4A, hatched and white bars) の算術和と比較して混合剤の活性 (Fig. 4A, black bar) が約半分になっていることか

ら明らかである。

比較のために、MG2/PGLa ペアでも同様に治療係数を評価した (Fig. 4B)。MG2 と PGLa については 1:1 のモル比で超分子複合体を形成し相乗効果を発揮することが様々な系において報告されている。<sup>24,39)</sup> MG2 単独, PGLa 単独, 1:1 混合剤の MIC は大腸菌に対して 20, 5,  $2.5 \mu\text{M}$  であり、よって FIC index = 0.31, 表皮性ブドウ球菌に対して 20-40, 2.5,  $1.25 \mu\text{M}$  で FIC index = 0.28 であった。よって FIC index は MG2/T-SS ペアと同等である。しかし、MG2/PGLa ペアは MIC の 100 倍濃度条件下において強い溶血活性を示し (Fig. 4B, black bar), MG2 を単独で用いた場合 (Fig. 4A, striped bar) と比較して治療係数に改善は見られなかった。これは、混合剤中に含まれる各々単独の活性 (Fig. 4B, hatched and white bars) の算術和との比較で明らかのように、MG2/PGLa ペアが溶血活性においても強い相乗効果を示すためである。

#### 5. 赤血球膜モデル (双イオン性リン脂質膜) における膜バリアー能破壊活性

ではなぜ MG2 と T-SS は抗菌活性においてのみ相乗効果を示すのであろうか。細菌細胞膜と赤血球膜との大きな違いの 1 つは、細菌細胞膜が負電荷を帯びた酸性リン脂質を豊富に含有しているのに対し、<sup>42)</sup> 赤血球膜外葉は電荷的に中性の双イオン性リン脂質でほぼ覆われている点である。<sup>43)</sup> そこで、Fig. 2 の酸性リン脂質含有膜の場合と同様に、双イオン性リン脂質 PC で構成されたりポソームを用い

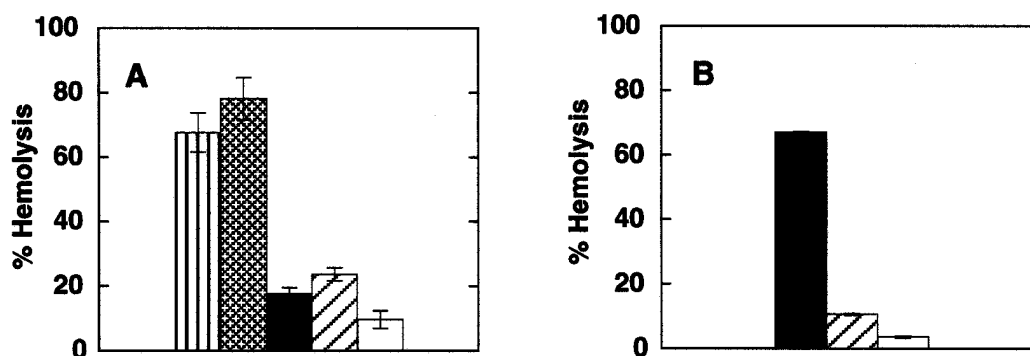


Fig. 4. Hemolytic Activities as a Measure of Toxicity

Peptides were incubated with 1% (v/v, final concentration) erythrocyte suspension for 1h at  $37^\circ\text{C}$ . Percent hemolysis was determined by measuring the absorbance of the supernatant after centrifugation. (A) Percent hemolysis values at  $100\times\text{MICs}$  are shown by bars. Striped:  $4000 \mu\text{M}$  MG2, cross-hatched:  $50 \mu\text{M}$  T-SS, closed: a mixture of  $12.5 \mu\text{M}$  T-SS and  $400 \mu\text{M}$  MG2. The values of individual peptides alone in the mixture are also shown by bars. Hatched:  $12.5 \mu\text{M}$  T-SS, open:  $400 \mu\text{M}$  MG2. (B) The percent hemolysis value of  $125 \mu\text{M}$  ( $=100\times\text{MIC}$ ) 1:1 mixture of PGLa and MG2 is shown by the closed bar. The values of individual peptides alone in the mixture are also shown by bars. Hatched:  $62.5 \mu\text{M}$  PGLa, open:  $62.5 \mu\text{M}$  MG2. (Reprinted with kind permission from [28]. Copyright 2001 American Chemical Society).

て膜バリアー能破壊作用における相乗効果を検討した (Fig. 5). MG2 と T-SS は, 酸性リン脂質含有膜の場合 (Fig. 2A) と比較して, 双イオン性リン脂質膜の場合には色素の漏出を引き起こすのに高いペプチド/脂質濃度比条件を必要とした (Fig. 5A). これは, これらのペプチドが細菌選択的に作用する性質と一致する. MG2/T-SS 混合剤の活性 (trace 3) と混合剤中に含まれる各々単独の活性の算術和 (trace 4) とを比較すると明らかなように, MG2/T-SS ペアは双イオン性リン脂質膜バリアー能破壊活性においては相乗効果を示さなかった. 一方 MG2/PGLa ペアでは強い相乗効果が見られた (Fig. 5B). これらの結果は溶血活性における結果と良く対応している. このように各モデル膜を用いた膜バリアー能破壊作用における結果 (Fig. 2 と Fig. 5) は, 生物活性の結果 (Table 1 と Fig. 4) と良く一致した. よって, MG2/T-SS ペアに見られた細菌

選択的な相乗効果が, 酸性リン脂質含有膜における膜バリアー能破壊作用と関連していることが示唆された. さらに MG2 と T-SS が酸性リン脂質 (PG) 含有膜でのみ膜バリアー能破壊作用における相乗効果を発揮したのはなぜかという疑問を明らかにしていくためには, PC 膜 (赤血球膜) と PG 含有膜 (細菌細胞膜) に対する膜バリアー能破壊メカニズムが同様であるかを検討する必要がある. MG2, PGLa と T-SS の酸性リン脂質含有膜における膜バリアー能破壊メカニズムについてはよく研究されている.<sup>6,7,32,33,36-39,40,41,44</sup> MG2 や PGLa は PG 含有膜中においてはある程度決まった大きさ (直径 2—3 nm) の一過性のペプチド-脂質超分子複合体ポアを形成し, 膜バリアー能と脂質非対称性の同時消失を起こすと考えられている (Fig. 6). T-SS も脂質非対称性の消失は確認されていないものの, 同様のメカニズムと推定されている. 一方, 電荷的に中性の

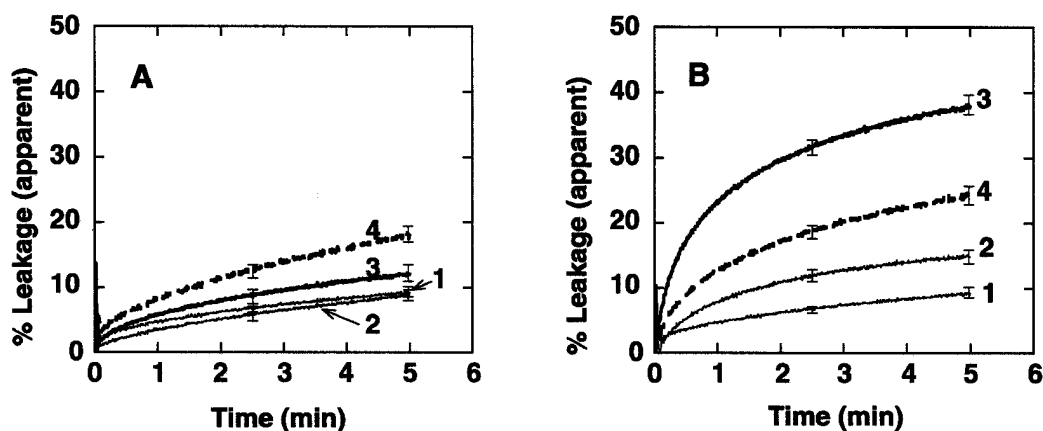


Fig. 5. Membrane Permeabilization Activity against PC LUVs

The release of calcein was fluorometrically detected at 30°C. [Lipid] = 4.5 μM. (A) Trace 1: 1 μM MG2, Trace 2: 1 μM T-SS, Trace 3: a mixture of 1 μM MG2 and 1 μM T-SS, Trace 4: the arithmetic sum of traces 1 and 2. (B) Trace 1: 1 μM MG2, Trace 2: 1 μM PGLa, Trace 3: a mixture of 1 μM MG2 and 1 μM PGLa, Trace 4: the arithmetic sum of traces 1 and 2. (Reprinted with kind permission from [28]. Copyright 2001 American Chemical Society).

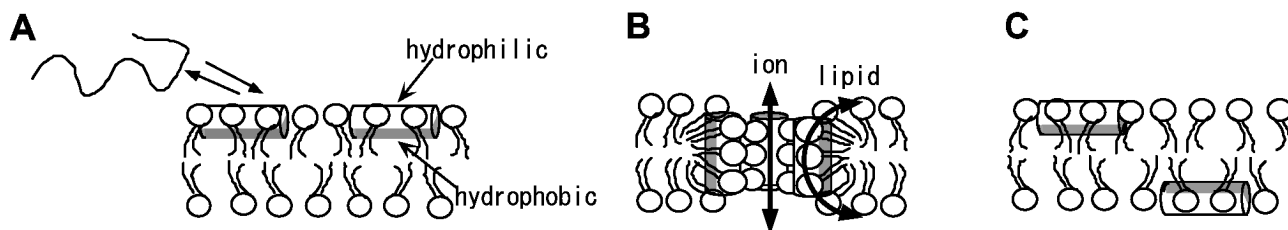


Fig. 6. A Model for Magainin 2-Lipid Bilayer Interactions<sup>6,7)</sup>

(A) The peptide forms an amphipathic helix in lipid bilayers, which essentially lies parallel to the membrane surface.<sup>37)</sup> (B) Five helices on average together with several surrounding lipids form a membrane-spanning pore comprising a dynamic, peptide-lipid supramolecular complex, which allows not only ion transport but also rapid flip-flop of membrane lipids.<sup>38)</sup> (C) Upon disintegration of the pore, a fraction of the peptide molecules is stochastically translocated into the inner leaflet.<sup>40,44)</sup> (Adapted with kind permission from Fig. 1 of [15]. Copyright 1997 American Chemical Society).

Peptide combinations Synergism in;	MG2 +	MG2 +	MG2 +
	T-SS	T-Acm	PGLa
Antimicrobial activity	+	±	+
Hemolytic activity	—		+
Acidic membrane permeabilization	+	—	+
Zwitter ionic membrane permeabilization	↓ ⋮ (larger membrane defects)		
	—		+

↓  
**Toward cocktail therapy**

Fig. 7. Synergism in Various Systems

PC 膜中での MG2 の膜バリアー能破壊メカニズムの詳細についてはまだ研究が進んでおらず、決まった大きさのポアを形成するのではなく脂質二分子膜の構造を乱すことによるのではないかと示唆する報告もあるが、<sup>45)</sup> 詳しいメカニズム解明は今後の課題である。

#### 6. おわりに—細菌選択的相乗効果—

様々な系における相乗効果の結果を Fig. 7 にまとめた。本研究によって、由来も構造も全く異なる MG2 と T-SS とが、溶血活性においては相乗効果を示さず、細菌選択的に相乗効果を発揮することが見いだされた。そして、MG2/PGLa ペアが細菌だけでなく赤血球に対しても強い相乗効果を示してしまうことと比較すると、MG2/T-SS ペアはより安全性の高い組み合わせであると言える。また、T-SS のかわりにその直鎖状誘導體 T-Acm を用いると相乗効果が消失したことから、MG2 との相乗効果発揮において T-SS の環状構造が重要であることが示唆された。また、細菌、赤血球、各々のモデル膜を用いて膜バリアー能破壊作用を検討した結果は、生物活性の結果と良く一致した。よって、MG2/T-SS ペアに見られた細菌選択的な相乗効果が、酸性リン脂質含有膜における膜バリアー能破壊作用と関連しており、またその際、より大きな膜障害が形成されるようになることが示唆された。

MG2 と T-SS による細菌選択的な相乗効果発揮の詳細なメカニズム解明については今後の展開が待たれる。この MG2/T-SS ペアのように溶血活性はそれほど上昇させずに抗菌活性のみ向上させる、さらに理想的なペプチドの組み合わせを追求し、また細菌選択的な相乗効果発揮の詳細なメカニズムを解明していくことで、抗菌性ペプチドを用いたカクテル療法開発につながると期待される。

**謝辞** 本研究は京都大学大学院薬学研究科薬物性学分野にて行われたものであり、本研究を遂行するに当たり終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学大学院生命科学研究所 松崎勝巳助教授に深謝致します。また有益な御助言御指導を賜りました先生方に深謝致します。また様々なご協力をいただいた共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Present address: Innate Immunity Laboratory, National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.
- 2) Boman H. G., *Scand. J. Immunol.*, **48**, 15-25 (1998).
- 3) Lehrer R. I., Ganz T., *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 23-27 (1999).
- 4) Hancock R. E. W., Scott M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8856-8861 (2000).
- 5) Zasloff M., *Nature*, **415**, 389-395 (2002).
- 6) Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 391-400 (1998).
- 7) Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 1-10 (1999).
- 8) Kobayashi S., Takeshima K., Park C. B., Kim S. C., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **39**, 8648-8654 (2000).
- 9) Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1562**, 32-36 (2002).
- 10) Boman H. G., Agerbath B., Boman A., *Infect. Immun.*, **61**, 2978-2984 (1993).
- 11) Park C. B., Kim H. S., Kim S. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 253-257 (1998).
- 12) Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E. W., *Biochemistry*, **38**, 7235-7242 (1999).
- 13) Epand R. M., Vogel H. J., *Biochim. Biophys.*

- Acta*, **1462**, 11–28 (1999).
- 14) Shai Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 55–70 (1999).
  - 15) Matsuzaki K., Nakamura A., Murase O., Sugishita K., Fujii N., Miyajima K., *Biochemistry*, **36**, 2104–2111 (1997).
  - 16) Maloy W. L., Kari U. P., *Biopolymers*, **37**, 105–122 (1995).
  - 17) Dathe M., Wieprecht T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 71–87 (1999).
  - 18) Tossi A., Sandri L., Giangaspero A., *Biopolymers*, **55**, 4–30 (2000).
  - 19) Chen J., Falla T. J., Liu H., Hurst M. A., Fujii C. A., Mosca D. A., Embree J. R., Loury D. J., Radel P. A., Chang C. C., Gu L., Fiddes J. C., *Biopolymers*, **55**, 88–98 (2000).
  - 20) Lee J. H., Minn I., Park C. B., Kim S. C., *Protein Expr. Purif.*, **12**, 53–60 (1998).
  - 21) Sharma A., Khoury-Christianson A. M., White S. P., Dhanjal N. K., Huang W., Paulhiac C., Friedman E. J., Manjula B. N., Kumar R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9337–9341 (1994).
  - 22) Zhang L., Benz R., Hancock R. E. W., *Biochemistry*, **38**, 8102–8111 (1999).
  - 23) Giacometti A., Cirioni O., Prete M. S. D., Paggi A. M., D'Errico M. M., Scalise G., *Peptides*, **21**, 1155–1160 (2000).
  - 24) Westerhoff H. V., Zasloff M., Rosner J. L., Hendler R. W., de Waal A., Vaz Gomes A., Jongsma A. P. M., Riethorst A., Juretic D., *Eur. J. Biochem.*, **228**, 257–264 (1995).
  - 25) Mor A., Hani K., Nicolas P., *J. Biol. Chem.*, **269**, 31635–31641 (1994).
  - 26) Zasloff M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5449–5453 (1987).
  - 27) Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y., *J. Biol. Chem.*, **263**, 16709–16712 (1988).
  - 28) Kobayashi S., Hirakura Y., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **40**, 14330–14335 (2001).
  - 29) Mackay M. L., Milne K., Gould I. M., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **15**, 125–129 (2000).
  - 30) Botelho M. G., *J. Dent.*, **28**, 565–570 (2000).
  - 31) Tamamura H., Ikoma R., Niwa M., Funakoshi S., Murakami T., Fujii N., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 978–980 (1993).
  - 32) Matsuzaki K., Nakayama M., Fukui M., Otake A., Funakoshi S., Fujii N., Bessho K., Miyajima K., *Biochemistry*, **32**, 11704–11710 (1993).
  - 33) Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K., *Biochemistry*, **36**, 9799–9806 (1997).
  - 34) Matsuzaki K., Sugishita K., Fujii N., Miyajima K., *Biochemistry*, **34**, 3423–3429 (1995).
  - 35) Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1327**, 119–130 (1997).
  - 36) Matsuzaki K., Fukui M., Fujii N., Miyajima K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 259–264 (1991).
  - 37) Matsuzaki K., Murase O., Tokuda H., Funakoshi S., Fujii N., Miyajima K., *Biochemistry*, **33**, 3342–3349 (1994).
  - 38) Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K., *Biochemistry*, **35**, 11361–11368 (1996).
  - 39) Matsuzaki K., Mitani Y., Akada K., Murase O., Yoneyama S., Zasloff M., Miyajima K., *Biochemistry*, **37**, 15144–15153 (1998).
  - 40) Matsuzaki K., Murase O., Miyajima K., *Biochemistry*, **34**, 12553–12559 (1995).
  - 41) Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K., Epanand R. M., *Biochemistry*, **37**, 11856–11863 (1998).
  - 42) “Microbial Lipids,” Vol. 1, ed. by Ratledge C., Wilkinson S. G., Academic Press, London, 1988.
  - 43) Verkleij A. J., Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Comfurius P., Kastelijnd D., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 178–193 (1973).
  - 44) Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K., *Biochemistry*, **34**, 6521–6526 (1995).
  - 45) Wieprecht T., Beyermann M., Seeling J., *Biochemistry*, **38**, 10377–10387 (1999).